


✓

ZAKLJUČNO POROČILO

O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA NA PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROGRAMA (CRP) »KONKURENČNOST SLOVENIJE 2006 – 2013«

 REPUBLIKA SLOVENIJA
NOSILEC JAVNEGA POOBLASTILA
JAVNA AGENCIJA ZA RAZISKOVALNO DEJAVNOST
REPUBLIKE SLOVENIJE, LJUBLJANA

I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta

1. Naziv težišča v okviru CRP:

Povezovanje ukrepov za doseganje trajnostnega razvoja

- 7 - 10 - 2009		Šig. z.:
Prejeto:		Pril.:
Številka zadeve:	63M3-299/06/16	Vrednost:

2. Šifra projekta:

V4-0313

16

3. Naslov projekta:

Diagnostika povzročiteljev boleznih vinske trte

3. Naslov projekta

3.1. Naslov projekta v slovenskem jeziku:

Diagnostika povzročiteljev boleznih vinske trte

3.2. Naslov projekta v angleškem jeziku:

Diagnostics of grapevine diseases

4. Ključne besede projekta

4.1. Ključne besede projekta v slovenskem jeziku:

vinska trta, fitoplazme, GLRaV, nepovirusi, nematode, bakterije, viroidi

4.2. Ključne besede projekta v angleškem jeziku:

grapevine, phytoplasma, GLRaV, nepoviruses, nematodes, bacteria, viroids

II. Vsebinska struktura zaključnega poročila o rezultatih raziskovalnega projekta v okviru CRP

1. Cilji projekta:

1.1. Ali so bili cilji projekta doseženi?

- a) v celoti
 b) delno
 c) ne

Če b) in c), je potrebna utemeljitev.

1.2. Ali so se cilji projekta med raziskavo spremenili?

- a) da
 b) ne

Če so se, je potrebna utemeljitev:

Trgatev obravnavanih trsov smo opravili 11. oktobra 2008. Tudi v tem primeru razlike med obema skupinama trsov niso bile značilne, saj je bila pri zdravih trsih povprečna teža pridelka 2,9 kg/trs (teža 100 jagod = 188 g; povprečna teža grozda = 166 g), sladkorna stopnja 90 oOe in vsebnost skupnih kislin 8,3 g/l; pri okuženih trsih pa je bila teža pridelka 3,0 kg/trs (teža 100 jagod = 174 g; povprečna teža grozda = 170 g), sladkorna stopnja 88oOe in vsebnost skupnih kislin 8,4 g/l. Iz zbranih enoletnih podatkov lahko zaključimo, da okuženost trsov z virusom RBDV v letu 2008 ni imela signifikantnega vpliva na količino in kakovost pridelka sorte Laški rizling, seveda pa je na podlagi enoletnih podatkov težko narediti končen sklep. Letošnja trgatev je v teku. Za natančnejšo opredelitev tega virusa na pridelek sorte Laški rizling bi bilo potrebno poskus nadaljevati še najmanj tri do štiri leta.

Veliki trtni kapar in virusi zvijanja listov vinske trte

Veliki trtni kapar (*Neopulvinaria innumerabilis*) se v vinogradih na Primorskem redno pojavlja že od sredine osemdesetih let. V zadnjih letih se ponekod opaža povečan pojav kaparja, ki lahko že sam po sebi na trti povzroča številne težave. Škodo povzroča s sesanjem rastlinskih sokov, zato močno okuženi šparoni odženejo kratke poganjke z malo ali nič pridelka. Če je napad zelo močan, lahko trs propade. Ličinke med rastjo izločajo obilno medeno roso, ki privablja številne, tudi škodljive, žuželke, na njej pa se razvije tudi sajavost, ki zmanjša asimilacijo listov in s tem vpliva na slabšo kakovost grozdja. Poleg tega je veliki trtni kapar znan tudi kot prenašalec virusov zvijanja listov vinske trte 1 in 3 (GLRaV-1, GLRaV-3), ki sta oba gospodarsko pomembna in vključena tudi v certifikacijsko shemo za pridelavo zdravega sadilnega materiala vinske trte. Oba virusa sta prisotna v rodnih vinogradih v Sloveniji, zato lahko povečanje populacij in razširjenost kaparja pospešita razširjanje virusov v nasadih, kar bi lahko imelo za posledico veliko gospodarsko škodo, tako zaradi virusov, kot tudi zaradi samega kaparja.

Detekcija GLRaV

Za detekcijo GLRaV smo uporabili serološko metodo DAS-ELISA, uporabljali smo protitelesa proizvajalca Bioreba. Testiranja smo izvajali po navodilih proizvajalca.

Rezultati

V letu 2006 smo vzorčili in testirali vzorce vinske trte z dveh lokacij na Primorskem, kjer je bil prisoten tudi kapar. Prva lokacija je bila v Biljenskih gričih, druga pa v Sečovljah. Po opravljenih seroloških analizah se je lokacija v Sečovljah izkazala kot praktično neokužena z GLRaV-1 in -3. Ugotovili smo da sta, od 180 testiranih, 2 trsa okužena z GLRaV-1, trije pa z GLRaV-3. Na lokaciji v Biljenskih gričih, kjer smo povzorčili in testirali 185 trsov, pa je bila okužba z virusi močnejša. V letu 2007 smo zato izbrali še dodatno lokacijo na Primorskem v Škocjanu, kjer je bil in je še vedno kapar močno prisoten in na tej lokaciji vzorčili 100 trsov za testiranje na prisotnost GLRaV. S testiranjem jeseni smo ugotovili, da je na lokaciji močno razširjen GLRaV-3, v manjši meri pa tudi GLRaV-1. Pri 48 trsih smo ugotovili okužbo z GLRaV-3, pri šestih okužbo z GLRaV-1, pri devetih pa mešano okužbo z obema. Na tej lokaciji smo v letu 2008 ponovili vzorčenje istih trsov kot v prejšnjem letu in opravili serološke analize. Pri 32 trsih smo ugotovili okužbo z GLRaV-3, pri 12 okužbo z GLRaV-1, pri 25 pa mešano okužbo z obema. Rezultati analize so pokazali, da se virusa v vinogradu širita, kar kaže na možno vlogo velikega trtnega kaparja pri prenosu GLRaV. Glede na razlike v okuženosti

V letu 2008 smo analizirali 36 vzorcev vinske trte na prisotnost GLRaV in fitoplazem. V petih vzorcih je bila potrjena samo prisotnost fitoplazem tipa počrnelost lesa, v 17 vzorcih pa le okužba z GLRaV-3. Pri dveh vzorcih smo potrdili okužbo tako s fitoplazmo počrnelost lesa, kot tudi okužbo z GLRaV-3, pri 12 vzorcih pa so bili rezultati analiz negativni. Podobno kot v letu 2007 smo tudi pri analizi teh vzorcev ugotovili, da samo na osnovi pojavljanja bolezenskih znamenj na rastlinah ne moremo zaključiti, kdo je njihov povzročitelj. Pri nekaj vzorcih, pri katerih smo opazili bolezenska znamenja tipična za fitoplazme, npr. sektorsko rdečenje in neenakomerno olesenost poganjkov, nismo potrdili okužbe s fitoplazmami, pač pa okužbo z GLRaV. Ravno tako pa pri določenih vzorcih z bolezenskimi znamenji GLRaV prisotnosti obeh iskanim virusov nismo potrdili, potrdili pa smo prisotnost fitoplazem.

Na podlagi rezultatov naše raziskave lahko zaključimo, da je vizualno ugotavljanje okužbe s fitoplazmami in/ali GLRaV na terenu zelo težavno in v večini primerov v praksi nezanesljivo. Posebno težavo povzročajo mešane okužbe z obema vrstama patogenov. Tako lahko na podlagi prisotnosti bolezenskih znamenj sklepamo na okužbo z omenjenimi patogeni, če pa je potrebna natančna identifikacija, je le-to potrebno izvesti z ustreznimi laboratorijskimi testi.

Ogorčice kot prenašalci virusov

Najnevarnejši prenašalci virusnih okužb v naravi so sicer žuželke, pomembno mesto, predvsem pri širjenju talnih virusov (nepovirusov), pa pripada ogorčicam. Za preživetje in širjenje talnih virusov je pomembna povezava med virusom, prenašalcem in gostiteljsko rastlino. O povezanosti talnih virusov in ogorčic so prvič pisali šele leta 1958 (Hewit, Raski in Goheen), ko so ugotovili povezavo med infektivno degeneracijo vinske trte (Grapevine fanleaf virus - GFLV) in vrsto *Xiphinema index*.

Ogorčice, ki prenašajo viruse, povzročajo pomembno gospodarsko škodo na številnih gojenih rastlinah. Do danes so ugotovili okoli dvajset virusov, katere prenašajo ogorčice, za nekatere pa to šele domnevajo. Virusi, ki jih prenašajo ogorčice, so prvenstveno paraziti samoniklih rastlin, ki postanejo gospodarsko pomembni, če neko občutljivo gojeno rastlino posejemo ali posadimo na okužena tla. Virusi in prenašalci so razširjeni po vsem svetu, njihovo število pa narašča iz dneva v dan.

Vinsko trto ogroža večje število virusov, med katerimi je potrebno prav posebno pozornost nameniti skupini talnih nepovirusov, za katere je značilno, da jih prenašajo prenašalci iz rodov *Xiphinema* in *Longidorus*.

Od znanih prenašalcev, povezanih z nepovirusi, ki se pojavljajo na vinski trti smo v Sloveniji doslej ugotovili le *X. diversicaudatum*, *X. index*, *X. vuittenezi*, *X. americanum* sensu lato in *L. elongatus*, od ostalih prenašalcev nepovirusov pa *X. rivesi*. Podrobnejše študije razširjenosti nepovirusov, njihovih prenašalcev in njihovih medsebojnih razmerij so bile v Sloveniji opravljene le na omejenem geografskem območju, kljub temu, da omenjeni organizmi predstavljajo precejšnjo grožnjo slovenski pridelavi grozdja, oziroma kljub temu, da je nekaj od naštetih organizmov celo na seznamu I.A.I (Peach rosette mosaic nepovirus, *X. americanum*, *L. diadecturus*).

Prisotnost nepovirusov in njihovih potencialnih prenašalcev, ogorčic smo ugotavljali na izbranih geografskih območjih, kjer njihove prisotnosti še nismo ugotavljali. Za identifikacijo ogorčic smo iz nabranih vzorcev zemlje ekstrahirali prisotne ogorčice in jih identificirali z uporabo morfoloških tehnik in po potrebi tudi metod na osnovi verižne reakcije s polimerazo. Za detekcijo nepovirusov pa smo uporabili serološko metodo DAS-

različne kombinacije začetnih oligonukleotidov in reagente različnih proizvajalcev. Potrdili smo okužbo štirih vzorcev z GYSVd in 4 vzorcev s HSVd.

Xylella fastidiosa

Bakterija *Xylella fastidiosa* (Wells et al., 1987) povzroča Piercovo bolezen vinske trte in še nekatere druge bolezni na različnih gostiteljskih rastlinah. *X. fastidiosa* lahko povzroča veliko gospodarsko škodo na rastlinah kot so vinska trta, agrumi in nekatere druge drevesne vrste (Hopkins and Purcell, 2002). Bolezni, ki jih povzroča se večinoma pojavljajo v toplejših predelih Severne (vinska trta) in Južne Amerike (agrumi), o bolezni na hruškah poročajo s Taiwana, pojavljajo pa se tudi osamljeni primeri okužb, kot na primer okužba vinske trte na Kosovu in mandljev v Indiji (EPPO/OEPP, 2004). Po poročanju organizacij za varstvo rastlin v Evropi bolezen ni prisotna, zato bakterijo *X. fastidiosa* kot tudi njene prenašalce uvrščamo na seznam I.A.I škodljivih organizmov (Direktiva sveta 2000/29/ES). Znamenja bolezni se kažejo v obliki kloroz in nekroz listov, ki se z napredovanjem bolezni popolnoma posušijo, vendar ne odpadejo. Bolezenska znamenja težko ločimo od tistih, ki so posledica glivnih okužb, škropljenja s herbicidi ali suše, kar pogosto oteži identifikacijo bolezni na terenu. Redni pregledi rastlin, vzorčenje in laboratorijska diagnostika so zato bistveni za zgodnje odkrivanje bolezni. Bakterija *X. fastidiosa* je počasi rastoča bakterija, prve kolonije se na selektivnih gojiščih pojavijo po desetih do štirinajstih dneh (Campanharo et al., 2002). Ker bakterijo običajno težko izoliramo iz rastlinskega tkiva, je zelo pomembno, da imamo na voljo drugo dovolj občutljivo metodo, ki bo zaznala nizke koncentracije bakterij v tkivu. Naš namen je bil vpeljati različne metode določanja te bakterije, in sicer gojenje bakterije *X. fastidiosa* na gojiščih, imunofluorescenčni test (IF), ELISA test, okuževanje rastlin v tkivnih kulturah ter vpeljava testa verižne reakcije polimeraze v realnem času (PCR-RČ).

Bakterijski sevi in gojišča

Iz mednarodnih zbirk bakterij smo pridobili naslednje reprezentativne izolate bakterije *Xylella fastidiosa* iz različnih gostiteljskih rastlin: *X. fastidiosa* ATTC 35879T, 2683 PCE-RR (ICPB 50025), ATTC Peach 4#5 (ICPB 50032) in ATTC 35871, PL788, 2679 PLM G83 (ICPB 50039), ATTC 93-1F (ICPB 50047). Izolati, ki smo jih uporabili v naših testih so sevi izolirani iz vinske trte, slive in breskve, ki smo jih dobili iz zbirke ATTC (ang. »American Type Culture Collection«). Za gojenje smo uporabili tekoči in trdni gojišči PD2 in PW (Schaad et al., 2000). Po končani inkubaciji smo bakterije prenesli na sveža gojišča. Najbolje rastoči sev (ICPB 50032) smo izbrali kot kontrolni sev za nadaljnje testiranje.

Vse bakterijske seve smo uspešno gojili v tekočih PD2 in PW gojiščih, manj uspešno pa je bilo gojenje na trdnih gojiščih. V nasprotju s trdnim gojišče, pa v tekočem gojišču s stresanjem zagotavljamo enakomerno razporeditev hranil ter kisika, kar pozitivno vpliva na razmnoževanje bakterij, ne glede na začetno koncentracijo.

Test indirektna imunofluorescence (IIF)

Kontrolne seve *X. fastidiosa* smo opazovali s fluorescentno mikroskopijo (oznaka mikroskopa Axioskop 2 Plus, Nikon), s testom IIF. Za detekcijo smo uporabili poliklonska protitelesa proizvajalca Loewe (Lot No.220601) in sekundarna protitelesa proizvajalca Sigma (Lot No. 065K6224), označena s FITC.

Bakterijske celice kontrolnih sevov smo uspešno opazovali pod mikroskopom s testom

ekstrakcije ali tip tkiva ne vpliva na mejo detekcije ELISA testa. Protitelesa niso kazala navzkrižne reaktivnosti z nobeno od testiranih bakterij iz rodu *Agrobacterium* kot tudi ne s fitoplazmami in rastlinskim tkivom *C. roseus* in *N. tabacum*.

Detekcija *Xylella fastidiosa* s PCR v realnem času

Vpeljava detekcijskega sistema

Protokol PCR-RČ za detekcijo *Xylella fastidiosa*, ki omogoča hitro in zanesljivo potrditev okužbe, so razvili Schaad in sod. (2002). Sistem omogoča potrditev patogene bakterije tako v laboratoriju kot tudi na terenu s prenosnim sistemom Smart Cycler (Cepheid). Oblikovali so dva seta začetnih oligonukleotidov na podlagi 16s rDNA in 16S-23S ITS regije. Rezultati so pokazali, da so 16S začetni oligonukleotidi nekoliko bolj občutljivi, medtem kot so ITS začetni oligonukleotidi nekoliko bolj specifični. Kasneje so Francis in sodelavci (2006) oblikovali univerzalne primerje za PCR in PCR-RČ. Oba protokola uporabljata TaqMan kemijo z 20 ali 30 minutnim Smart Cycler protokolom. Po primerjavi obeh setov začetnih oligonukleotidov smo se odločili, da bomo uporabili protokol in začetne oligonukleotide Schaad et al., zaradi višje občutljivosti v primerjavi s Francis et al.

Analiza vzorcev iz Slovenskih vinogradov in testiranje navzkrižne reaktivnosti

S PCR-RČ smo testirali 19 vzorcev iz petih Slovenskih vinogradov. Ekstrakte smo pripravili na več načinov (Glej Detekcija *X. fastidiosa* z ELISA testom – Priprava rastlinskega materiala) in iz njih izolirali DNA z uporabo magnetnih delcev (King Fisher). Za pripravo reakcijske mešanice, smo uporabili liofiliziran master miks (Omni Mix HS, Cepheid), kateremu smo dodali ITS začetne oligonukleotide in sondo (Schaad et al., 2002). V vsako mikrocentrifugirko smo dodali 23 μ L master miksa in 2 μ L vzorca ter nastavili 20 minutni protokol, ki ga priporočajo Schaad in sod. (2002).

Da bi preverili občutljivost testa, smo pripravili umeritveno krivuljo z redčenjem izolirane DNA *X. fastidiosa* tako, da smo pripravili desetkratne redčitve od 101 celic/mL do 108 celic/mL. Občutljivost smo ocenili na 103 celic/mL oziroma 2 celici na reakcijo, kar ustreza podatkom iz literature (Schaad et al, 2002; Francis et al., 2006) in je približno sto do tisočkrat višja občutljivost kot smo jo določili za ELISA test.

V nobenem od vzorcev vinske trte, ki smo jih testirali nismo potrdili prisotnosti *X. fastidiosa*, prav tako nismo ugotovili navzkrižne reaktivnosti protiteles oziroma začetnih oligonukleotidov z rastlinskim tkivom, fitoplazmami in dugimi bakterijami ter mešano mikrofloro vinske trte.

Agrobacterium na vinski trti

Bakterijski rak koreninskega vratu na vinski trti, ki ga povzročajo bakterije iz rodu *Agrobacterium*, je ena najpomembnejših bakterijskih boleznih vinske trte. V letih, ko so pogoji za razvoj bakterije ugodni (zimsko in spomladansko pozemba, uporaba totalnih herbicidov (glifosat), rez, premočno gnojenje z dušikom, prevelika obloženost trsa...), le-te lahko povzročijo veliko škodo v trsnicah in mladih vinogradih. Bakterije iz rodu *Agrobacterium* imajo zelo širok krog gostiteljskih rastlin na katerih povzročajo škodo. Vinsko trto navadno okužuje biovar 3 ali *Agrobacterium vitis*, vendar je patogen tudi biovar 1 oz. *Agrobacterium tumefaciens*, medtem ko *Agrobacterium rizogenes* na vinski trti povzroča šopasto razrast koreninskega sistema. V letu 2005 smo v nekaterih vinogradih opazili močne okužbe in propadanje vinske trte okužene z bakterijami iz rodu *Agrobacterium*. Močnim okužbam običajno botrujejo stresne situacije, predvsem nizke

S to metodo smo 75 izolatov določili kot *A. vitis*, 6 kot *A. tumefaciens* in 3 kot *A. rhizogenes*. Od 81 izolatov ki smo jih s PehA določili kot *A. vitis*, jih je bilo torej 73 potrjeno tudi z multipleks PCR kot *A. vitis*. 4 izolati so bili z multipleks PCR negativni, 3 so bili določeni kot *A. tumefaciens* in 1 kot *A. rhizogenes*. Izmed 9 izolatov, negativnih s PehA pa so bili z multipleks PCR trije določeni kot *A. tumefaciens*, 2 kot *A. vitis*, 2 kot *A. rhizogenes* in dva sta bila tudi s to metodo negativna.

Za ugotavljanje tumorogenosti agrobakterij smo vpeljali PCR s parom začetnih oligonukleotidov tnr, ki pomnožuje specifično zaporedje na Ti plazmidu, kjer je zapis za tumorogenost bakterij. Pozitiven rezultat smo dobili le pri 27 izolatih od katerih je bila pri 26 izolatih tumorogenost potrjena tudi s testom patogenosti. S primerjavo testa patogenosti, kjer smo ugotovili, da je tumorogenih 60 izolatov, in PCR za tumorogenost s tnr začetnimi oligonukleotidi lahko zaključimo, da je test patogenosti občutljivejši. Za identifikacijo tumorogenih bakterij smo poskušali vpeljati tudi 'semi-nested'-PCR, vendar se pri nas ni izkazal kot uporaben, zato testiranja izolatov s to metodo nismo izvedli.

Nekatere izbrane izolate smo poslali na potrditev v referenčni laboratorij. Rezultati iz referenčnega laboratorija so potrdili naše identifikacije.

Najhitrejše in najučinkovitejše dokazovanje prisotnosti agrobakterij je multiplex PCR s katerim dokažemo tudi vrsto agrobakterij. Kadar pa želimo dokazati tudi tumorogenost pa izvedemo še test patogenosti ali PCR s tnr začetnimi nukleotidi. Izvedena raziskava nam bo omogočila zanesljivejše in hitrejše odkrivanje in diagnosticiranje povzročitelja v okuženih trsih in sadilnem materialu, kjer je detekcija povzročitelja še posebej zahtevna.

3.3. Kateri so **neposredni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

V okviru projekta smo dobili več neposrednih rezultatov, pomembnih za razvoj kmetijstva. Vsi opisani rezultati so pomembni tako neposredno za samo vinogradništvo kot posredno kot podpora različnim uradnim organom.

Opravili smo prve raziskave vpliva okužbe z novo odkritim virusom na vinski trti, Raspberry bushy dwarf virusom. Prvi rezultati kažejo, da bistvenega vpliva virusa na količino in kvaliteto pridelka ni, vendar pa so take raziskave dolgotrajne, zato bi bilo potrebno z njimi nadaljevati še vsaj 3 do 4 leta.

Ugotovili smo, da se na izbrani lokaciji v slovenskem Primorju okužba z GLRaV-1 in -3 v vinogradu širi. Različne vrste kaparjev so znane kot prenašalci posameznih virusov vinske trte, v izbranem vinogradu pa smo opazili močno okužbo z velikim trtnim kaparjem (*Neopulvinaria vitis*). Zaradi prisotnosti potencialnega prenašalca in širjenja okužbe v vinogradu domnevamo, da je omenjeni kapar prenašalec enega ali obeh virusov. Rezultati, pridobljeni v okviru projekta bodo služili kot osnova za nadaljnje študije interakcij med virusi in kaparji.

Z opravljenimi analizami istih vzorcev na prisotnost GLRaV in fitoplazem smo ugotovili, da je razlikovanje med bolezenskimi znamenji obeh vrst patogenov izjemno težavno in nezanesljivo. Ugotovili smo, da na podlagi prisotnosti bolezenskih znamenj lahko sklepamo na okužbo s tema vrstama patogenov, v primeru, da je potrebna natančnejša identifikacija povzročitelja, pa je le-to potrebno izvesti z ustreznimi laboratorijskimi testi.

Z analizami zemlje na prisotnost ogorčic smo identificirali pet vrst iz rodu *Longidorus* in pet vrst iz rodu *Xiphinema*. Med njimi smo identificirali štiri pomembne virusonosne vrste, ki so znane kot prenašalci več vrst nepovirusov. Dva izmed njih, GFLV in ArMV, sta v Sloveniji prisotna. Za nepoviruse je znano, da povzročajo veliko gospodarsko škodo, nekateri izmed njih so karantenski organizmi. Poznavanje razširjenosti potencialnih prenašalcev virusov v Sloveniji je pomembno z vidika obvladovanja bolezni in izvedbe ukrepov ob morebitni najdbi ali vnosu novega virusa v Slovenijo.

Uvedli smo nove metode za identifikacijo in detekcijo nekaterih patogenov. Za detekcijo treh viroidov na vinski trti smo uvedli RT-PCR in z njim prvič potrdili okužbo vinske trte z GYSVd-1 in HSVd v Sloveniji. Metodo PCR v realnem času za detekcijo bakterije *Xylella fastidiosa* smo prilagodili za uporabo na prenosnem aparatu SmartCycler, kar bo v prihodnosti omogočilo izvajanje metode tudi na terenu v samih vinogradih ali drugih vstopnih točkah materiala vinske trte. Metodo PCR v realnem času smo uporabili tudi za testiranje vzorcev vinske trte iz slovenskih vinogradov, ki so kazali znamenja bolezni podobna Piercovi bolezni. Rezultati analize rastlinskega materiala iz vinogradov so bili negativni, kar potrjuje opažanja, da podobna znamenja bolezni povzročajo tudi drugi škodljivi organizmi. Rezultate smo aktivno predstavljali v strokovnih krogih. Za ločevanje različnih vrst iz rodu *Agrobacterium* smo vpejali multipleks PCR, ki nam omogoča istočasno določanje štirih vrst agrobakterij. Za določanje tumorogenosti agrobakterij smo uvedli PCR metodo, ki pa je še vedno manj učinkovita kot prilagojen test patogenosti na treh izbranih vrstah testnih rastlin.

4. Sodelovanje z tujimi partnerji:

4.1. Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujimi raziskovalnimi inštitucijami.

4.2. Kakšni so rezultati tovrstnega sodelovanja?

5. Bibliografski rezultati³ :

Za vodjo projekta in ostale raziskovalce v projektni skupini priložite bibliografske izpise za obdobje zadnjih treh let iz COBISS-a) oz. za medicinske vede iz Inštituta za biomedicinsko informatiko. Na bibliografskih izpisih označite tista dela, ki so nastala v okviru pričujočega projekta.

6. Druge reference⁴ vodje projekta in ostalih raziskovalcev, ki izhajajo iz raziskovalnega projekta:

HREN, Matjaž, DREO, Tanja, SKUBIC Jana, NIKOLIĆ, Petra, GRUDEN, Kristina, DERMASTIA, Marina, CAMLOH, Marjana, RAVNIKAR Maja. Poglavje v knjigi "Methodologies and results in grapevine research" Serge Delrot (ed.) z naslovom "Real-time PCR detection methods for economically important grapevine related bacteria" v katerem je med drugim predstavljena metoda PCR v realnem času za detekcijo *Xylella fastidiosa*. (V tisku)

³ Bibliografijo raziskovalcev si lahko natisnete sami iz spletne

⁴ Navedite tudi druge raziskovalne rezultate iz obdobja finančnega projekta, ki niso zajeti v bibliografske izpise, zlasti pa tiste, ki se nanašajo na prenos znanja in tehnologije.

Navedite tudi podatke o vseh javnih in drugih predstavitev projekta in njegovih rezultatov vključno s predstavitevami, ki so bile organizirane izključno za naročnika/naročnike projekta.